

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1938-1939. — N° 301

RECHERCHES
SUR
LES CÉNAPSES

LIPIDO-PROTÉIDIQUES ACIDO-PRÉCIPITABLES
DU SÉRUM SANGUIN DE L'HOMME
ET DE DIVERS VERTÉBRÉS

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention "PHARMACIE"

présentée et soutenue publiquement le samedi 8 juillet 1939

FAR

Louis-Joseph-Jules-Marie DIZERBO

Pharmacien-Chimiste de la Marine
Licencié ès Sciences

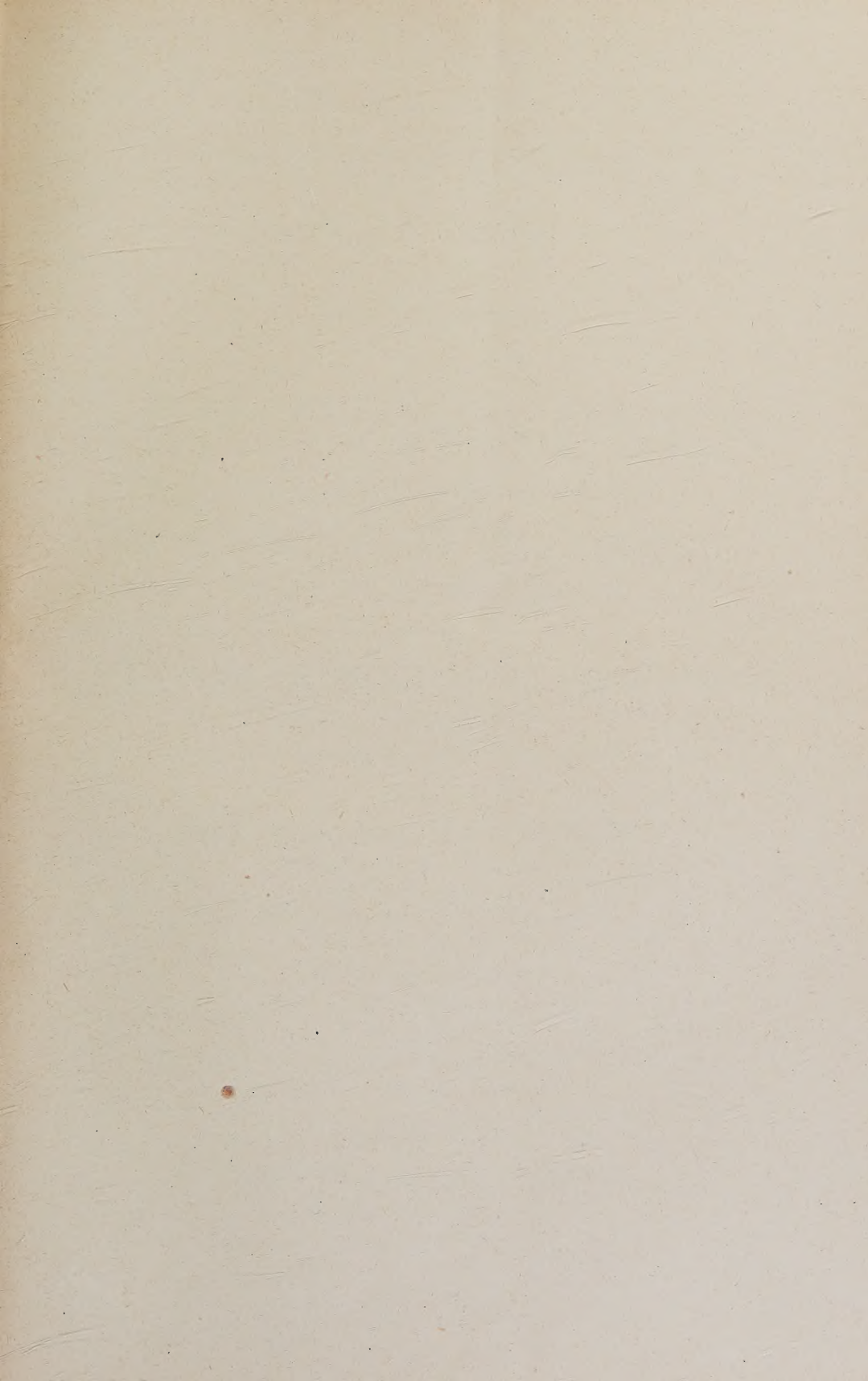
Né à BREST (Finistère), le 19 décembre 1914

Examineurs de la Thèse	{	MM. MACHEBOEUF, professeur	Président.
		LABAT, professeur	Juges.
		FABRE, professeur	
		WANGERMEZ, professeur	

BORDEAUX
IMPRIMERIE-LIBRAIRIE DELMAS

6, Place Saint-Christoly

1939





Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

1938-1939. — N° 301

RECHERCHES
SUR
LES CÉNAPSES

LIPIDO-PROTÉIDIQUES ACIDO-PRÉCIPITABLES
DU SÉRUM SANGUIN DE L'HOMME
ET DE DIVERS VERTÉBRÉS

THÈSE POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ

Mention "PHARMACIE"

présentée et soutenue publiquement le samedi 8 juillet 1939

PAR

Louis-Joseph-Jules-Marie DIZERBO

Pharmacien-Chimiste de la Marine
Licencié ès Sciences

Né à BREST (Finistère), le 19 décembre 1914

Examineurs de la Thèse	{	MM. MACHEBOEUF, professeur	Président.
		LABAT, professeur	Juges.
		FABRE, professeur	
		WANGERMEZ, professeur	

BORDEAUX
IMPRIMERIE-LIBRAIRIE DELMAS

6, Place Saint-Christoly

1939

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYEN : M. MAURIAC.

ASSESEUR : M. LABAT.

DOYEN HONORAIRE : M. C. SIGALAS.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. POUSSON, MOURE, BARTHE, DENIGÈS, BEILLE, CASSAËT,
CHAVANNAZ, C. SIGALAS, SÂBRAZÈS, BÉGOUIN, DUPOUY.

PROFESSEURS :

	MM.		MM.
Clinique médicale	MAURIAC.	Zoologie et parasitologie	MANDOUL.
id.	DUPRÉ.	Médecine expérimentale	AUBERTIN.
Clinique chirurgicale et gynécologique	GUYOT.	Clinique ophtalmologique	TEULIÈRES
Clinique chirurgicale	PAPIN.	Clinique chirurg. infantile et orthopédie	ROCHER.
Pathologie et thérapeutique générales	CARLES.	Clinique méd. des maladies des enfants	CRUCHET.
Clinique d'accouchements	ANDÉRODIAS.	Chimie biologique et médicale	MACHEBOEUF.
Anatomie pathol. et microscopie clinique	DAMADE.	Physique médicale et pharmaceutique	WANGERMEZ.
Anatomie	VILLEMIN	Médec. coloniale et clin. des mal. exotiques	BONNIN.
Anatomie générale et histologie	G. DUBREUIL.	Clinique des malad. cutanées et syphilitiques	PETGES.
Hygiène	LEURET.	Clinique des maladies des voies urinaires	DUVERGEY
Médecine légale et déontologie	LANDE.	Clinique des malad. nerveuses et mentales	ABADIE.
Electroradiologie et clin. d'électricité médic.	RÉCHOU.	Clinique d'oto-rhino-laryngologie	PORTMANN.
Chimie	CHELLE.	Toxicologie et hygiène appliquée	LABAT.
Botanique et matière médicale	GOISE.	Hydrologie thérapeutique et climatologie	CREYX.
Pharmacie	VITTE.	Clinique odonto-stomatologique	DUBECQ.
Physiologie	FABRE.		

MM. LACOSTE (Histologie). PERY (Obstétrique). PERRENS (Maladies mentales). R. SIGALAS (Parasitologie et sciences naturelles). JEANNENEY (Chirurgie générale).

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.		MM.
Anatomie	DUFOUR.	Chirurgie générale	LOUBAT.
Physiologie	N.	id.	MASSÉ.
Médecine générale	PIÉCHAUD.	id.	DARGET.
id.	DELMAS-MARSALET.	id.	N.
id.	DE GRAILLY.	Obstétrique	RIVIÈRE.
id.	FONTAN.	Ophtalmologie	BEAUVIEUX.
id.	BROUSTET.	Oto-rhino-laryngologie	DESPONS.
id.	DERVILLEE.	Dermatologie et syphiligraphie	JOULIA.
id.	N.	Physique médicale	N.
Chirurgie générale	CHARRIER.	Chimie générale pharmaceut. et toxicologie	N.

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.		MM.
Médecine opératoire	JEANNENEY.	Ophtalmologie	CABANNES (en congé).
Accouchements	RIVIÈRE.	Physique médicale et pharmaceut. que	AURIAC.
Pathologie médicale	DELMAS-MARSALET.	Anatomie	J. BEAUVIEUX.
Puériculture	FAUGÈRE.	Chimie minérale	CASTAGNOU.
Zoologie et parasitologie	R. SIGALAS.	Botanique	GIRARD.
Médecine légale	DERVILLEE.	Pharmacie galénique	MESNARD.
Urologie	DARGET.	Bactériologie	MOUREAU
Législation pharmaceutique	POPLAWSKI.	Physiologie	PETITEAU.

Orthopédie chez l'adulte, pour les accidentés du travail, les mutilés de guerre et les infirmes. N.

Le Secrétaire de la Faculté : ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation

A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MA MERE

Faible témoignage de reconnaissance
pour tout ce qu'elle a fait pour moi.

A MA FEMME

A MA BELLE-SŒUR

A MON FRERE

A MA NIECE

A LA MEMOIRE DE MES GRANDS-PARENTS

A MON GRAND-PERE

A MES BEAUX-PARENTS

A TOUS MES PARENTS

MEIS ET AMICIS

A MES PROFESSEURS
DU SERVICE DE SANTE DE LA MARINE

A MES MAITRES DE STAGE CIVILS ET MILITAIRES

A MONSIEUR LE DOCTEUR DE COQUET

Chef des Travaux pratiques de Chimie biologique.

Expression de ma respectueuse gratitude pour la bienveillance avec laquelle il m'a toujours accueilli.

A LA MEMOIRE

DU PROFESSEUR CAILLE

de l'Ecole de Pharmacie de Rennes.

A LA MEMOIRE

DU PROFESSEUR DELAUNAY

A MES JUGES

A MONSIEUR LE MÉDECIN GÉNÉRAL CAZAMIAN

*Directeur de l'Ecole Principale du Service de Santé
de la Marine et des Troupes coloniales,
Commandeur de la Légion d'honneur,
Officier du Mérite maritime,
Officier de l'Instruction publique.*

A MONSIEUR LE PHARMACIEN CHIMISTE GÉNÉRAL SAINT-SERNIN

*Inspecteur général des Services pharmaceutiques et chimiques,
Commandeur de la Légion d'honneur,
Officier de l'Instruction publique.*

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR M.-A. MACHEBOEUF

*Chevalier de la Légion d'honneur,
Officier de l'Instruction publique.*

Avec l'expression de notre gratitude pour l'extrême bienveillance qu'il nous a toujours témoignée et pour le grand honneur qu'il nous a fait en nous admettant dans son laboratoire, où il nous a constamment prodigué ses directives éclairées.

RECHERCHES SUR LES CÉNAPSES

LIPIDO-PROTEIDIQUES ACIDO-PRÉCIPITABLES

DU SÉRUM SANGUIN DE L'HOMME

ET DE DIVERS VERTÉBRÉS

INTRODUCTION

Le sérum sanguin contient plusieurs grammes de lipides par litre. Ces substances, insolubles dans l'eau, sont cependant dissoutes dans le sérum, en une phase aqueuse limpide, grâce à leur liaison avec des protéides, comme a pu le démontrer Machebœuf il y a une dizaine d'années. Cet auteur en effet, en soumettant les albumines de sérums de cheval à un fractionnement méthodique, a pu en séparer une fraction constituée par 60 p. 100 environ de protéides et 40 p. 100 environ de lipides, et cependant parfaitement soluble dans l'eau en milieu neutre ou alcalin. Les lipides et les protéides s'y trouvent dans un état physico-chimique très particulier, qui les masque à divers de leurs réactifs et modifie grandement leurs propriétés physiques. Les lipides, en effet, y sont solubles dans l'eau et insolubles dans l'éther, et les protéides sont solubles à froid dans l'alcool assez concentré. Des tentatives de fractionnement plus poussées ne permettent pas de séparer les lipides des protéides. On se trouve en présence d'une fraction bien définie constituée par des lipides et des protéides liés entre eux. Pour désigner ces

ensembles complexes formés par l'union de lipides et de protéides, Machebœuf créa le terme de « cénapses lipido-protéidiques ».

Les protéides de la matière vivante sont souvent ainsi unis à d'autres constituants tissulaires, lipides et glucides surtout et substances diverses (cénapses lipido-protéidiques et glucido-protéidiques). L'importance biologique de ce fait est considérable. Tout d'abord, les propriétés physico-chimiques des divers constituants des organismes sont ainsi modifiés par leur union avec les protéides; et l'on rencontre, dans les tissus par exemple, des lipides dissous dans de l'eau ainsi que du glycogène insoluble dans l'eau. D'autre part, les propriétés physiologiques des protéides naturels sont très souvent déterminées par diverses substances non protéidiques qui leur sont accolées pour former des cénapses : nous ne prendrons pour illustrer ce fait que quelques exemples parmi tant d'autres :

1° Les euzymes, dont la constitution chimique a pu être suffisamment étudiée, se sont toutes montrées comme étant des cénapses formées par l'union à un protéide d'une substance non protéidique. Les deux constituants de l'euzyme, quand ils sont détachés, sont l'un et l'autre inactifs, mais la cénapse qu'ils forment est une substance d'activité biochimique considérable, l'euzyme (exemple : ferment jaune de Christian et Warberg, 1933 : union d'un protéide et de la vitamine B₂).

2° Les lipides constitutifs des protoplasmes sont masqués aux réactifs microchimiques habituels des lipides, tels que le Soudan III ou l'oxyde d'osmium. Il faut, pour que ces lipides soient démasqués, dénaturer les protéides par un réactif coagulant, tel que l'alcool chaud, ou bien lyser les protéides par une euzyme protéolytique (Ciaccio).

3° Les lipides du plasma sanguin influent considérablement sur l'ionisation des protéides auxquels ils sont liés. Ils sont donc un facteur important de la pression de Starling, du plasma, qui est, on le sait, le facteur principal de la régu-

lation des échanges d'eau et de sels entre les tissus et le sang au niveau des capillaires.

4° Lorsque le contact entre un antigène et les anticorps d'un antisérum spécifique produit l'apparition d'un précipité antigène-anticorps (réaction des précipitines), ce sont les protéides du sérum qui s'unissent à l'antigène pour constituer ce précipité; mais si ces protéides ont été purifiés et libérés des lipides qui leur étaient liés, la précipitation n'a pas lieu (Linderstrom-Lang et Horsfall et Goodner).

5° La spécificité antigénique des antigènes naturels est déterminée non seulement par les protéides de ses antigènes, mais aussi par des molécules non protéidiques qui leur sont liées. Ces molécules non protéidiques (haptènes) ne sont pas elles-mêmes capables d'inciter à la formation d'anticorps : elles ne le peuvent que lorsqu'elles sont unies en cénapses à des protéides (Landsteiner et nombreux auteurs).

La notion de l'existence de liaisons entre les protéides et d'autres constituants de la matière vivante a permis d'éclairer d'un jour nouveau de nombreux processus biologiques primordiaux. Mais comment expliquer que des substances telles que des lipides, aux affinités chimiques peu marquées, soient liées à des protéides ? On ne conçoit pas une liaison chimique par valence primaire entre des glycérides neutres ou des stérides par exemple, et des protéides.

Machebœuf et Sandor, à la suite d'une longue série d'études sur les cénapses du sérum, ont pensé que certains lipides pouvaient être simplement unis aux protéides par solvation réciproque de portions semblables des molécules lipidiques et protéidiques. Les molécules des lipides sont essentiellement constituées par de longues chaînes polyméthyléniques présentant à l'une de leurs extrémités une fonction ester. Les molécules des protéides contiennent de place en place des chaînes polyméthyléniques et des cycles benzéniques, dont les affinités de solvation pour les chaînes polyméthyléniques de lipides sont grandes. Les lipides pourraient ainsi

être accolés aux protéides par simple solvation réciproque de leurs portions moléculaires semblables. Des recherches récentes ont apporté un puissant argument en faveur de cette théorie : si l'on fait arriver, au contact des cénapses lipido-protéidiques du sérum, des substances hydrosolubles et constituées par des chaînes polyméthyléniques, telles que des savons, ces substances, agissant en quelque sorte par action de masse, déplacent les lipides des cénapses et se fixent à leur place pour former de nouvelles cénapses protéide-savons, tandis que les lipides libérés précipitent.

Parmi toutes ces cénapses du sérum sanguin il en est cependant certaines qui résistent à l'action des savons et même à l'action combinée du savon et de l'éther. A ces cénapses remarquablement stables, qui sont les moins solubles en milieu acide (pH 4 à 4,2), nous réservons le nom de « cénapses acido-précipitables de Machebœuf », ou, pour abrégé, « C.A.M. », car ce sont celles que cet auteur avait étudiées les premières. Pour elles, il est encore impossible, actuellement, d'échafauder une hypothèse quant à la nature des liaisons qui relie les lipides et les protéides.

Les protéides, constitutifs des C.A.M. sont identiques aux autres albumines du sérum; elles ont même point isoionique et même action sur les équilibres de membranes, lorsque, par une méthode appropriée et ne les dénaturant pas, on les a débarrassées de leurs lipides (méthode de dilapidation de Hardy et Gardner).

Ce n'est donc pas à une nature particulière des protéides qui entrent dans leur constitution que l'on doit attribuer les propriétés spéciales et notamment la stabilité si remarquable des cénapses C.A.M.; ce n'est pas non plus à une nature spéciale de leurs lipides, puisque ces lipides sont simplement des stérides et des phosphatides, identiques à ceux que l'on rencontre dans les autres cénapses du sérum, c'est le mode de liaison entre protéides et lipides qui diffère, et ce mode de liaison nous est encore, dans ce cas particulier, totalement inconnu.

La quantité de C.A.M. que l'on rencontre dans le sérum de cheval est approximativement 3 grammes par litre, représentant à peu près un septième des lipides totaux et un cinquantième des protéides totaux du sérum.

La technique d'obtention des C.A.M. que Machebœuf avait mise au point était fort longue et fort complexe; elle n'était pas établie dans le but d'une séparation quantitative de ces cénapses, mais pour démontrer leur existence et les purifier le plus possible. L'application d'une technique précise, mais trop longue et trop complexe, était impossible pour étudier les variations quantitatives des C.A.M. Une technique un peu plus simple avait déjà été employée et Machebœuf a bien voulu nous associer à ses recherches, en nous proposant de chercher une technique simplifiée d'obtention des C.A.M., permettant d'opérer sur un volume réduit de sérum, et dont la mise en œuvre ne demanderait pas une trop longue série de manipulations. Une telle technique pouvait en effet permettre l'étude des variations physiologiques et pathologiques des C.A.M. Pour cela il était surtout important de parvenir à une méthode donnant toujours des résultats comparables entre eux du point de vue quantitatif.

L'exposé des essais, qui nous ont conduit à préciser cette technique, et des résultats qu'elle nous a donnés pour diverses espèces animales, est l'objet de la présente thèse.

RAPPEL DES TRAVAUX ANTERIEURS SUR LES CENAPSES ACIDO-PRECIPITABLES DE MACHEBŒUF

*Technique originale de Machebœuf
qui permet de mettre en évidence l'existence des C. A. M.
et de les étudier.*

Pour rappeler cette technique on ne peut mieux faire que de reproduire textuellement le résumé qu'en donne l'auteur lui-même dans une monographie qu'il a publiée récemment (*Exposés de biologie*, Actualités scientifiques, Hermann, édit., Paris, 1937, vol. 448; *Etat des lipides dans la matière vivante*, p. 24 et suiv.) :

« Pour être certain de l'existence des complexes lipido-protéidiques et cholestéro-protéidiques, et se faire une idée de leur nature, il fallait en obtenir certains séparés, au moins grossièrement d'avec les autres constituants du sérum pour pouvoir les soumettre à une étude physico-chimique convenable. C'est à ce problème que je me suis attaqué.

» Gardner et Gainsborough (1927) avaient déjà noté que la majorité des substances lipoïdiques du sérum restait en solution lorsqu'on précipite les globulines par le sulfate d'ammoniaque à demi-saturation. J'avais constaté le même fait (1927) pour le cas particulier du phosphore lipoïdique du sérum. Par cette opération, on obtient une solution limpide contenant la majorité des lipides du sérum en présence du sulfate d'ammonium à demi-saturation. Ce fait déjà est intéressant, car il montre la stabilité de l'état dissous des lipides sériques qui ne sont pas entraînés par le précipité des globulines, qui apparaît cependant en présence des sels neutres à forte concentration.

» Pour tenter l'isolement des complexes lipido-protéidiques, je me suis donc adressé à la solution des albumines et lipides obtenue après précipitation des globulines.

» J'ai d'abord montré que si l'on ajoute un peu plus de sulfate d'ammonium et de l'acide sulfurique dilué (N S) jusqu'à ce que le pH soit 3,9 ou 3,8, la précipitation des albumines et des lipides est à très peu près quantitative.

» Fait très remarquable, ce précipité obtenu se remet parfaitement en solution limpide si l'on ramène le pH à 7 ou au-delà (neutralité). La précipitation des lipides est donc parfaitement réversible. Cette réversibilité est un argument nouveau en faveur d'un état très spécial des lipides, car pour toutes les émulsions aqueuses de lipides que l'on peut préparer artificiellement, une telle réversibilité n'est jamais constatée.

» Lorsque l'ensemble des albumines et lipides est ainsi remis en solution grâce à de l'eau distillée et à la petite quantité d'ammoniaque diluée nécessaire pour ramener à la neutralité, on peut, en acidifiant à nouveau à pH 3,8 ou 3,9, obtenir la précipitation d'une notable quantité de substances, mais comme la teneur en sels neutres est beaucoup moins élevée que lors de la première précipitation des albumines, la majeure partie des protéïdes reste en solution. Le nouveau précipité est très riche en lipides, tous les lipides cependant, ne sont pas précipités, il en reste une fraction assez notable dans les eaux-mères; ce fait montre une fois de plus combien est grande la stabilité de l'état dissous de certains lipides qui restent ainsi en solution dans l'eau en présence de quantités assez notables encore de sulfate d'ammonium et en milieu acide (pH 3,8).

» Le précipité qui est constitué de protéïdes et de lipides est encore parfaitement soluble dans l'eau, si l'on ramène le pH à 7 environ. La réversibilité de la précipitation des lipides est complète, et pourtant la quantité de protéïdes qui les accompagne est beaucoup moins forte que lors de la première précipitation. Après avoir dissous ainsi une deuxième fois le précipité dans l'eau grâce à la quantité d'ammoniaque diluée nécessaire pour neutraliser, on peut opérer une troisième précipitation qui se fait en présence

de moins de sels que la deuxième, et ainsi on peut continuer une série de dissolutions dans l'eau à pH 7 (ou supérieur à 7), suivies chacune d'une précipitation par acidification à pH 3,8.

» Pour chaque précipitation, il reste dans les eaux-mères des substances le moins facilement précipitables par acidification. Pendant les quatre ou cinq premières précipitations, le précipité s'enrichit en lipides et s'appauvrit en protéides, mais, par la suite, sa composition reste à peu près constante, et le contenu des eaux-mères finit par avoir une composition comparable à celle du précipité.

» La fraction ainsi purifiée est très soluble dans l'eau en milieu neutre ou alcalin; elle ne précipite pas dans ces conditions par addition de quantités, même notables, de sels neutres (sulfate d'ammonium à demi-saturation, par exemple). Les solutions aqueuses sont parfaitement limpides, et pourtant cette fraction si soluble dans l'eau est constituée par moins de 60 p. 100 seulement de protéides et plus de 40 p. 100 de lipides (phosphatides et stérides). Les solutions aqueuses agitées avec de l'éther ne livrent pas leurs lipides à l'éther, même en présence de sulfate d'ammonium ou de chlorure de sodium.

» Bien plus, si à une solution aqueuse de cette fraction à pH 7,4, par exemple (qui correspond à celui du sérum), on ajoute un excès d'alcool absolu, la précipitation des protéides est nulle si la solution est diluée ou seulement très incomplète si la solution est concentrée. Il faut, pour obtenir la coagulation des protéides, porter le liquide alcoolique à l'ébullition pendant au moins cinq ou six minutes. On parvient ainsi à la coagulation totale des protéides par l'alcool, même à température ordinaire, à condition d'attendre pendant un nombre de jours parfois très grand.

» En résumé, dans la fraction lipido-protéidique ainsi extraite des albumines du sérum, non seulement les lipides sont solubles dans l'eau et masquées à leurs solvants (éther, benzène, etc.), mais en outre, les protéides eux-mêmes sont masqués à leur réactif coagulant qu'est l'alcool.

» Chacun des constituants de la fraction : protéides, stérides, phosphatides, présente donc, dans cette fraction, des caractères de solubilité dans l'eau; dans l'alcool ou dans l'éther complètement différents des caractères qu'il présente lorsqu'il est isolé... »

Il est bien évident que ce bref résumé donné par l'auteur ne mentionne pas les nombreux essais préliminaires qui ont conduit à l'établissement de cette technique.

Les variations de teneur des divers constituants avaient été suivies pas à pas au cours des précipitations successives effectuées pour purifier le plus possible la fraction C.A.M. Ces précipitations avaient été poursuivies jusqu'à ce que la fraction reste constante et soit identique à celle du contenu des eaux-mères. L'auteur ne désira pas toujours opérer sur une fraction aussi difficilement obtenue et il indique, par exemple, à la page 30 de la monographie déjà citée, une technique simple et rapide d'obtention d'une fraction moins purifiée, mais déjà très comparable à la fraction la plus soigneusement préparée. « En effet, dit-il, on peut séparer du sérum des cénapses analogues sans toutes les manipulations que je viens de décrire. Il suffit pour cela de partir de la solution des albumines débarrassées des globulines par le sulfate d'ammonium à demi-saturation; on ajoute à cette solution un sixième ($1/6$) de son volume de solution saturée de sulfate d'ammonium, puis de l'acide sulfurique dilué (normal au cinquième) jusqu'à pH 4 environ. On recueille rapidement le précipité par centrifugation. Il contient, nous l'avons vu, toutes les albumines et tous les lipides qui les accompagnent. On reprend ce précipité par de l'eau distillée qui laisse insoluble une fraction assez notable; on lave cette fraction à plusieurs reprises avec de l'eau distillée. Le résidu insoluble est constitué par des lipides et des protéides en quantités à peu près égales. Cet ensemble, cependant, est parfaitement soluble dans l'eau si l'on ajoute la petite quantité d'ammoniaque diluée nécessaire pour amener le pH à 7. La solution obtenue est lim-

pide malgré sa haute teneur en lipides et sa teneur relativement faible en protéides. Elle ne livre pas ses lipides à l'éther, elle ne précipite pas par addition de quantités assez notables de sels neutres. Ses protéides sont mal précipités par l'alcool froid, nous sommes donc ici en présence de cénapses lipido-protéidiques, bien que les manipulations nécessaires pour les obtenir soient brèves et peu énergiques : une simple acidification vers pH 4, suivie de lavages à l'eau distillée. On peut même obtenir par la même méthode une fraction comparable en acidifiant moins encore et en opérant à pH 4,7, comme pour la cristallisation de la sérum-albumine. Si l'on opère ainsi à pH 4,7, on se trouve au point iso-électrique des albumines, dans les conditions habituelles de leur cristallisation et de leur purification. Il est donc difficile d'admettre que les cénapses lipido-protéidiques que l'on obtient sont formées grâce à une dénaturation des albumines. »

Cette technique simplifiée ne fut proposée par l'auteur que dans le but d'obtenir très facilement et rapidement, en vue de certains essais, une fraction grossièrement comparable à celle qu'il avait tout d'abord isolée. Il ne cherchait pas à opérer quantitativement. Mais il pensa qu'une étude plus détaillée de cette technique pouvait conduire à l'établissement d'une méthode simple d'étude quantitative des C.A.M. du sérum et il voulut bien nous proposer d'effectuer cette étude. Nos essais sur ce sujet feront l'objet d'un chapitre ultérieur de cette thèse.

Propriétés des C.A.M.

La fraction C.A.M. préparée par la technique originale de Machebœuf se présente sous l'aspect d'un précipité amorphe très peu soluble dans l'eau lorsque le pH est inférieur à 4,5, mais entièrement soluble quand le pH dépasse 6.

Si par exemple on met une masse assez grande de la fraction en présence d'un très petit volume d'eau et de la très faible quantité d'ammoniaque nécessaire pour neutraliser le

mélange, on voit la matière solide se gonfler lentement et progressivement et absorber toute l'eau, pour donner finalement une gelée ferme absolument limpide, teintée de jaune. Si l'on ajoute un peu plus d'eau, le gonflement de la gelée se poursuit lentement, et l'on obtient finalement une masse gluante transparente : si la quantité d'eau est un peu plus élevée encore, on obtient une solution rigoureusement limpide pouvant contenir, par exemple, une centaine de grammes de lipides par litre. Cette solubilité dans l'eau de substances cependant absolument insolubles dans ce solvant, telles que des stérides, est un fait très remarquable. Bien plus, les solutions aqueuses ainsi obtenues peuvent être agitées longuement avec de l'éther ou de la ligroïne sans que leurs lipides en soient extraits.

Machebœuf et Tayeau ont montré que les savons alcalins décollent une forte proportion des lipides du sérum et cependant si l'on ajoute à une solution de C.A.M. une solution concentrée du savon alcalin, en maintenant le mélange vers pH 7,2 ou 7,5, on peut agiter le mélange avec de l'éther sans que ce solvant enlève du cholestérol ou des phosphatides que contient en si grande abondance la solution de C.A.M.

Machebœuf et Januszkiewicz ont montré que le point isoionique de la fraction C.A.M. est 5,6, tandis que celui des albumines du même sérum est 5,2. Cependant, en étudiant les protéides constitutifs des C.A.M., après les avoir séparés de leurs lipides par une méthode qui ne les dénature pas (technique de délipidation de Hardy et Gardiner), ils ont constaté que ces protéides avaient rigoureusement le même isoionique que les autres albumines du sérum. L'isoionique des protéides était modifié par la présence des lipides. La solubilité de ces protéides et leur ionisation sont également profondément modifiées par la liaison avec les lipides. En effet, la fraction C.A.M. est extrêmement peu soluble dans l'eau à pH 4 par exemple; tandis que la solubilité des protéides délipidés est considérable à ce même pH.

Machebœuf et Sándor, puis Machebœuf et Januskiewicz ont aussi montré l'influence des lipides sur l'ionisation des protéides. On sait que l'ionisation d'un protéide est le facteur déterminant principal de la pression d'équilibre dans un équilibre de Donnan, si la solution placée dans l'osmomètre est à un pH éloigné de l'isoionique du protéide. Or la pression d'équilibre pour une masse donnée de protéides à l'état de C.A.M. est très différente de celle mesurée dans des conditions identiques pour une masse égale d'albumines du même sérum, mais libres de toute liaison avec des lipides. Si, par contre, on compare les pressions d'équilibres pour des masses égales de protéides délipidées provenant de C.A.M. et pour des albumines du même sérum, on trouve qu'elles sont identiques. Les lipides liés aux protéides à l'état de C.A.M. influent donc considérablement sur l'état d'ionisation des protéides.

La capacité d'ionisation des protéides du plasma sanguin joue un rôle de tout premier ordre dans la régulation des échanges d'eau et de sels entre les tissus et le sang au niveau des capillaires. L'importance des cénapses lipido-protéidiques chez les lipémiques et les œdémateux est donc sans doute grande, et ceci ajoute un intérêt pratique indéniable à l'étude des cénapses du sérum humain, donc à la recherche que nous avons entreprise d'une technique relativement simple d'isolement des C.A.M.

C'est en étudiant le sérum de cheval que Machebœuf découvrit l'existence des C.A.M. et tous les travaux effectués depuis lors sur cette intéressante fraction furent poursuivis sur du sérum de cheval, ou très exceptionnellement sur du sérum humain. Mais Machebœuf lui-même, au cours d'essais inédits qu'il a bien voulu nous communiquer, avait constaté que le sérum de mouton ne contenait pas de cénapses du type C.A.M. Quelle était donc la fréquence de telles cénapses dans le règne animal ? Tel est le deuxième problème que nous nous sommes proposé. On sait que les sérums de tous les mammifères et des oiseaux contiennent

en abondance des lipides : se pouvait-il que les cénapses lipido-protéidiques de ces différents sérums ne soient pas comparables, tout au moins quant aux C.A.M. ?

Un troisième problème, enfin, pouvait être abordé si nous parvenions à mettre au point une technique de dosage assez précise sans être trop complexe, des cénapses du type C.A.M. : il nous était alors possible d'étudier les variations physiologiques et pathologiques de la teneur du sérum sanguin en ces cénapses. Une étude de ce genre avait été à peine esquissée par Macheboeuf, Wahl et Sandor, qui avaient constaté que la teneur du sérum en ces cénapses ne variait pas au cours des néphroses lipoïdiques ou de la cirrhose du type Laënnec, maladies dans lesquelles les constituants protéidiques et lipoïdiques du sérum subissent des modifications profondes. Ces cénapses C.A.M. sont-ils donc une caractéristique immuable du sérum de chaque espèce animale, ou bien sont-ils variables au cours de différentes évolutions physiologiques et pathologiques ?

Ce troisième problème, trop vaste, nous ne pouvions le traiter dans son ensemble. Il nous était cependant possible de l'aborder, et nous avons cherché à savoir si l'organisme était capable de régénérer les C.A.M. avec facilité. Pour cela nous avons soumis des lapins à des pertes plasmatiques abondantes et répétées en évitant autant que possible les pertes en globules sanguins, car ces dernières auraient superposé leurs effets à ceux que nous avions l'intention d'étudier. Sur ces animaux, nous avons noté les variations quantitatives de C.A.M.

De nombreuses études physiologiques et pathologiques des C.A.M. doivent être entreprises à l'avenir, nous semble-t-il, car nous avons eu la chance de mettre au point une méthode relativement facile et rapide de mesurer la teneur du sérum en ces cénapses, méthode qui permet d'opérer sur un volume relativement faible de sérum.

RECHERCHES PERSONNELLES

Recherches effectuées en vue de mettre au point une technique de dosage des C.A.M.

Machebœuf et Januskiewicz ont montré que les C.A.M. sont très peu solubles dans l'eau lorsque le pH est compris entre 3,8 et 4,5, même si le milieu est très pauvre en sels, tandis que les albumines et les autres cénapses albumino-lipidiques sont beaucoup plus solubles dans ces conditions. Si l'on précipite l'ensemble des albumines par acidification à pH 4 en présence d'une forte concentration en sulfate d'ammonium, le précipité obtenu ne peut pas être remis entièrement en solution, si on le traite par un volume d'eau distillée pas trop considérable. Dans ces conditions, il reste une fraction qui ne peut être dissoute dans de l'eau que si l'on ajoute la très petite quantité d'ammoniaque nécessaire pour neutraliser le mélange ou pour porter au moins son pH au-dessus de 6. Nous avons pensé qu'une séparation convenable des C.A.M. pouvait être obtenue en utilisant ce lait, mais il fallait préciser dans quelles conditions devait être effectué le traitement par de l'eau distillée puisque les C.A.M. ne sont pas insolubles dans l'eau distillée à pH 4, mais seulement peu solubles. Il fallait opérer de façon à dissoudre le plus possible des albumines tout en dissolvant le moins possible de C.A.M., et préciser, en outre, l'importance de l'erreur causée par la solubilité non négligeable des C.A.M.

Le principe de nos essais fut le suivant : le précipité constitué par l'ensemble des albumines, formé par acidification

à pH 4 ou 4,5 en présence de la quantité optimale de sulfate d'ammonium, fut recueilli, puis traité par un petit volume d'eau distillée une première fois. Le précipité recueilli à nouveau fut traité une deuxième fois par un petit volume d'eau distillée, puis recueilli. Le précipité subit ainsi plusieurs traitements successifs par une série de portions d'eau distillée et analysé après chaque traitement. Nous avons ainsi pu tracer des courbes représentatives des variations de teneur du précipité en ses divers constituants en fonction des lavages successifs et nous avons cherché les conditions optimales, c'est-à-dire les volumes d'eau de lavage, les plus convenables pour qu'après un nombre restreint de lavages le précipité atteigne une constitution qui ne varie plus si on poursuit les lavages. Il est évident que si l'on répète un trop grand nombre de fois les lavages, on finit par tout dissoudre; mais lorsque la constance de composition est obtenue, la pente des courbes correspond simplement à la solubilité de la fraction la moins soluble, c'est-à-dire des C.A.M. Il était alors possible d'extrapoler en tenant compte des volumes d'eau de lavage de façon à se faire une idée, au moins approximative, de la quantité de C.A.M. qu'avaient dû dissoudre les lavages précédents ayant servi à éliminer les substances autres que les C.A.M.; donc de connaître, avec une approximation suffisante, la teneur du sérum en C.A.M.

SÉPARATION PRÉALABLE DES GLOBULINES.

Nos essais ne devaient évidemment porter que sur les albumines, puisque c'est seulement dans cette fraction que se trouvent les C.A.M.

Nous avons, pour éliminer les globulines du sérum, opéré suivant la technique classique d'Hofmeister au sulfate d'ammonium.

Le sérum est additionné d'un égal volume de solution saturée de sulfate d'ammonium (préalablement neutralisée). Les globulines précipitent; on les recueille par centrifugation,

puis, pour leur enlever la petite quantité d'albumine qu'elles auraient pu entraîner, on les remet en solution dans un peu d'eau distillée, pour les précipiter à nouveau par demi-saturation en sulfate d'ammonium. Les solutions mères des deux précipitations des globulines sont rassemblées : elles contiennent les albumines; c'est sur la solution ainsi obtenue que va porter dans tous les cas notre étude. Cette solution est demi-saturée en sulfate d'ammonium.

PRÉCIPITATION DE L'ENSEMBLE DES ALBUMINES.

Pour précipiter l'ensemble des albumines, nous avons opéré en augmentant tout d'abord un peu la concentration en sulfate d'ammonium, puis en ajoutant goutte à goutte une solution demi-normale d'acide sulfurique jusqu'à pH 4 environ. Il n'est pas nécessaire de préciser rigoureusement le pH auquel on doit opérer, car on a également une excellente précipitation à pH 3,8. Une simple détermination colorimétrique à la touche sur un papier indicateur suffit amplement. Pour obtenir le pH entre 3,8 et 4,5 nous avons utilisé deux papiers indicateurs préparés au moment même de l'emploi, en imbibant deux bandes de papier-filtre de deux solutions d'indicateurs :

- l'un des papiers était imbibé d'une solution alcoolique diluée de rouge de méthyle;
- l'autre, d'une solution alcoolique de rouge Congo.

Le premier devait virer à la touche au rouge cerise et le second ne pas virer franchement au violet, mais de teintes très légèrement de violet très pâle. Dans ces conditions, le pH obtenu était inférieur à 4,5 et supérieur à 3,8, donc parfaitement convenable.

Le précipité d'albumine formé dans ces conditions était recueilli par centrifugation, puis aussitôt soumis aux séries de lavages à l'eau.

Nous avons naturellement effectué une série d'essais pré-

liminaires pour préciser les limites dans lesquelles nous devons nous tenir pour chercher les quantités optimales d'eau distillée à mettre en œuvre pour les lavages. Ces essais préliminaires n'ayant plus d'intérêt maintenant, nous les laissons de côté.

Protocole d'une expérience de lavages en série des albumines en vue de la séparation des C.A.M.

C'est sur du sérum de cheval fraîchement récolté sur des chevaux sains qu'ont été effectuées les expériences qui nous ont conduits à préciser la technique d'obtention rapide des C.A.M.

Nous donnerons ici, tout d'abord, le protocole et les résultats de l'expérience définitive qui nous permet d'établir la technique. Nous indiquerons ensuite quelques-uns des essais préliminaires qui pourront être ainsi considérés par leur concordance comme de simples vérifications de l'expérience qui va être décrite. Les volumes de sérum mis en œuvre (34 cm^3 par prise d'essai) n'ont pas été choisis arbitrairement. Ils étaient les plus grands volumes que nous pouvions étudier dans les conditions fixées par les essais préliminaires, étant donné le volume des tubes du centrifugeur que nous avions à notre disposition. Dans six tubes de centrifugeur, nous avons placé six échantillons identiques de 34 cm^3 d'un même sérum de cheval. Dans chaque tube nous avons ajouté peu à peu en agitant 34 cm^3 de la solution saturée et neutralisée de sulfate d'ammonium purifié. Après avoir agité soigneusement pendant cinq minutes nous avons séparé les précipités de globuline par centrifugation. Les liquides surnageant contenaient les albumines; ils furent décantés séparément dans six tubes de centrifugeurs. Les culots de globulines furent séparément remis en solution dans 8 cm^3 d'eau distillée et les globulines furent précipitées une seconde fois par addition de 8 cm^3 de solution saturée de sulfate d'ammonium.

Les globulines furent finalement recueillies par centrifugation et jetées tandis que leurs eaux-mères de deuxième précipitation étaient séparément réunies aux six solutions d'albumine correspondantes déjà recueillies. Nous avons ainsi, en six tubes de centrifugeur, six solutions identiques contenant chacune les albumines de 34 cm³ de sérum. A chacune de ces solutions nous avons ajouté par petites pincées du sulfate d'ammonium en poudre, en agitant, jusqu'à ce qu'il se forme un louche persistant à l'agitation. Dans ces conditions, la concentration en sulfate d'ammonium est juste suffisante pour que l'acidification à pH 4 provoque la précipitation pratiquement totale des albumines. Nous avons donc dans les six tubes ajouté en agitant la petite quantité de solution normale d'acide sulfurique nécessaire pour amener le pH au voisinage de 4 (virage au rouge franc du rouge de méthyle et au lilas à peine sensible du rouge Congo, par les essais à la touche sur papiers indicateurs). Après avoir agité pendant cinq minutes, de façon à homogénéiser parfaitement le contenu de chaque tube, nous avons centrifugé pour recueillir l'ensemble des albumines de chaque prise d'essai. Les solutions surnageantes furent éliminées, après avoir vérifié que l'addition de deux gouttes de solution normale d'acide ne provoque plus l'apparition de précipité.

Nous avons ainsi six tubes de centrifugeurs contenant chacun les albumines de 34 cm³ de sérum précipitées à pH 4.

C'est sur ces culots que nous avons fait porter la série des lavages par de l'eau distillée. Mais, tandis que pour le premier tube nous n'avons effectué qu'un seul lavage au moyen de 7 cm³ d'eau, nous avons fait deux lavages pour le deuxième tube, trois pour le troisième, et ainsi de suite, le sixième culot d'albumine étant seul soumis à six lavages consécutifs.

Des essais préliminaires nous avaient montré que les conditions optimales étaient les suivantes : 7 cm³ d'eau pour les premiers et deuxièmes lavages, puis 5 cm³ pour les troisièmes et quatrièmes et, enfin, 3 cm³ pour les derniers. Pour

chaque lavage, la quantité d'eau nécessaire était très progressivement ajoutée au précipité en agitant soigneusement avec une baguette de verre, de façon à ne pas laisser de grumeaux, qui se seraient ensuite mal divisés dans un grand volume d'eau et auraient pu être une cause d'irrégularités dans nos courbes. Le contact entre l'eau et le précipité était chaque fois de dix minutes, pendant lesquelles l'agitation était poursuivie. Après ce temps, les parties non dissoutes étaient recueillies par centrifugation pour être, suivant les cas, analysées, ou, au contraire soumises à un nouveau lavage.

Le tableau suivant résume les opérations de lavage en indiquant pour chacun des six tubes les lavages effectués et les volumes d'eau distillée utilisés pour chaque lavage.

TUBES	LAVAGES	1er	2e	3e	4e	5e	6e
	en cm ³						
N° 1...	Vol. d'eau	7	—	—	—	—	—
N° 2...	—	7	7	—	—	—	—
N° 3...	—	7	7	5	—	—	—
N° 4...	—	7	7	5	5	—	—
N° 5...	—	7	7	5	5	3	—
N° 6...	—	7	7	5	5	3	3

Nous avons enfin analysé le contenu final de chacun des tubes. Nous pouvions ainsi comparer les constitutions des résidus insolubles après un nombre variable de lavages et savoir, par conséquent, jusqu'où nous devons poursuivre les lavages pour obtenir une fraction de composition consistante, puis déterminer également la solubilité de cette fraction elle-même dans les eaux de lavage. Afin d'éviter toute action dénaturante sur les protéides de l'acidité, toutes les opérations, depuis la première précipitation des globulines jusqu'au dernier lavage, ont été pratiquées en une seule journée.

Pour simplifier notre exposé, nous avons désigné chacune des fractions obtenues par un indice : A₁ correspond aux albumines lavées une seule fois; A₆, aux albumines lavées

six fois; l'indice dont est affectée la lettre A indique le nombre de lavages qui ont été effectués, pour obtenir la fraction correspondante.

Chacune des fractions fut analysée de la façon suivante :

Le culot recueilli par centrifugation après le dernier lavage est additionné dans le tube centrifugeur lui-même de 2 cm³ d'eau et de la très petite quantité d'ammoniaque diluée (ammoniaque commerciale diluée au dixième) nécessaire pour amener le mélange vers pH 7, on agite pour dissoudre; la dissolution totale n'est pas instantanée. Lorsque la dissolution est terminée, on ajoute 20 cm³ d'alcool à 96°. On agite, puis on place le tube dans de l'eau chaude jusqu'à ce que l'alcool entre en ébullition. On règle la température du bain-marie de façon à maintenir une douce ébullition de l'alcool. Après dix minutes on arrête le chauffage et on laisse refroidir dans le bain-marie. Après une heure environ, le coagulum de protéides est rassemblé par centrifugation. On recueille par décantation la solution alcoolique qui est placée dans un ballon de distillation à rodage où seront rassemblées toutes les solutions alcooliques et éthérées obtenues, comme il va être dit, en lavant le coagulum protéidique. Le coagulum resté dans le tube de centrifugeur est additionné de 20 cm³ d'alcool à 96°. On agite, puis on porte l'alcool à l'ébullition comme ci-dessus, pendant dix minutes. On sépare à nouveau le coagulum par centrifugation et l'on réunit la solution alcoolique à la précédente dans le ballon à distiller. Le coagulum protéidique est traité une troisième fois par de l'alcool bouillant qui est également décanté dans le ballon. Le coagulum est alors traité à deux reprises, par 20 cm³ d'éther tiède que l'on laisse en contact pendant deux heures chaque fois. Les solutions éthérées sont réunies aux solutions alcooliques dans le ballon à distiller. Le coagulum protéidique est enfin traité par un peu d'alcool, pour enlever l'éther, puis deux fois par de l'eau chaude qui lui enlève les sels et les substances hydrosolubles qu'il peut contenir.

Ces eaux de lavages ne sont pas conservées. Au moyen d'un peu d'alcool, on fait tomber quantitativement le coagulum dans un godet taré où il est desséché au bain-marie d'abord, puis à l'étuve à 110° (une nuit à l'étuve). Le godet est enfin placé dans un dessiccateur à vide contenant de l'anhydride phosphorique, où il est laissé jusqu'à poids constant. Une pesée de précision de ce godet permet alors de connaître la quantité de protéides présents dans la fraction étudiée.

Pour déterminer la quantité de substances lipoidiques qui accompagnaient les protéides dans la fraction, l'ensemble des solutions alcooliques et étherées, qui avaient été rassemblées dans le ballon rodé, est soumis à une distillation sous vide pour éliminer les solvants sans oxyder les lipides. L'évaporation est poursuivie jusqu'à ce que le résidu soit bien sec.

Le résidu est constitué en majeure partie par des substances lipoidiques. Il contient également de petites quantités de substances non lipoidiques (traces de sels et de substances diverses) que l'alcool hydraté du premier lavage avait pu dissoudre. Pour éliminer ces substances, le résidu est repris quantitativement par du chloroforme; la solution est filtrée sur papier convenable; le ballon et le filtre sont lavés au moyen d'un peu de chloroforme et les solutions chloroformiques sont recueillies dans une fiole de Fourneau tarée avec précision. Le chloroforme est chassé par évaporation à la température de 50° environ, en insufflant dans la fiole à la surface de son contenu un constant courant d'azote qui entraîne les vapeurs et évite toute oxydation. Le résidu lipoidique est desséché jusqu'à poids constant, dans un dessiccateur à vide, puis son poids est déterminé par une pesée de précision.

Voici les résultats obtenus dans l'une de nos expériences :

FRAC- TIONS	NOMBRE DE LAVAGES correspondants	POIDS DE PROTÉIDES et de lipides correspondant à 34 cm ³ de sérum		POIDS TOTAL de la fraction pour 34 cm ³ de sérum	POIDS RAPPORTÉS AU TITRE DE SÉRUM (en grammes)			RAP- PORTS LIPIDES- PROTÉIDE
		Lipides	Protéides		Lipides	Protéides	Total	
		en mgr.	en mgr.	en mgr.				
A ₁	1	53	569	622	1,56	16,73	18,30	0,093
A ₂	2	37,5	146	183	1,10	4,29	5,39	0,257
A ₃	3	29	108	137	0,83	3,17	4,02	0,268
A ₄	4	24,2	88	112	0,70	2,58	3,28	0,276
A ₅	5	20	70	90	0,59	2,06	2,65	0,286
A ₆	6	17,8	62	79,8	0,52	1,82	2,34	0,287

Ces résultats nous ont permis de tracer les courbes ci-contre.

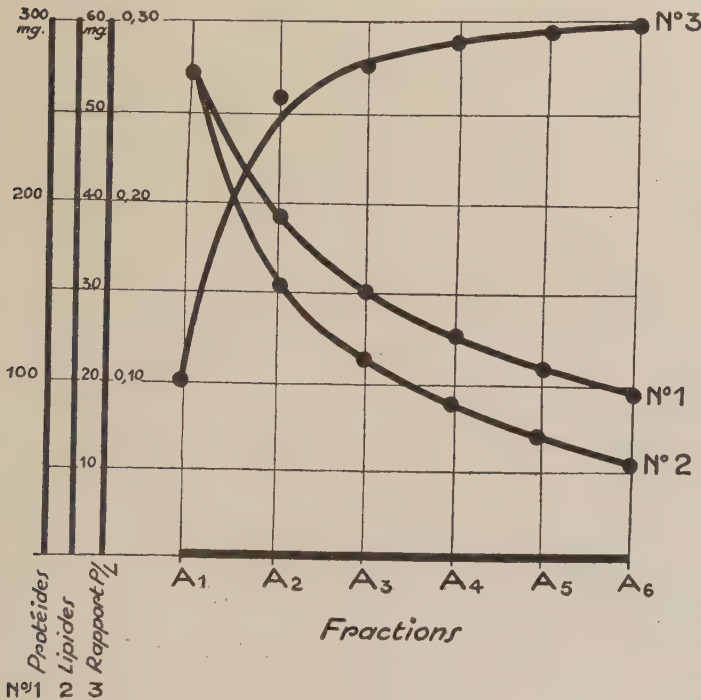
La courbe n° 1 représente les variations de la teneur en lipides des fractions, en fonction du nombre des lavages pratiqués pour obtenir ces fractions.

La courbe n° 2 représente la teneur des fractions en protéides.

La courbe n° 3 correspond aux rapports $\frac{\text{protéides}}{\text{lipides}}$ dans les diverses fractions.

L'examen des résultats et des courbes montre tout d'abord que la constitution de la fraction est pratiquement constante dès que le nombre des lavages atteint 4. Les lavages ultérieurs ne font que dissoudre progressivement la fraction elle-même et la pente des courbes après le quatrième lavage permet de connaître la solubilité de la fraction C.A.M. Si l'on compare, en effet, les rapports protéides/lipides des fractions A₅ et A₆, on constate qu'ils sont rigoureusement identiques; ce que dissout le sixième lavage a donc une composition identique à celle de la fraction elle-même. Ce sixième lavage opéré avec 3 cm³ d'eau a dissous 8 milligrammes de protéides et 2 mg. 2 de lipides, soit en tout 10,2 mg. de fraction C.A.M. Si donc on admet que, lors des lavages antérieurs, la présence de substances étrangères à la fraction

C.A.M. ne modifiait pas sensiblement la solubilité des C.A.M., on peut calculer la quantité totale de fraction C.A.M. qui a été dissoute par les 30 cm³ d'eau utilisée pour l'ensemble des six lavages : 102 mg. de C.A.M. Mais ce chiffre est probablement en léger excès par rapport à la réalité, car le premier lavage a été effectué avec de l'eau qui s'est chargée en sulfate d'ammonium, au contact du précipité primitif des



albumines. Or ce sel diminue probablement un peu la solubilité des C.A.M., comme il diminue la solubilité de l'ensemble des albumines. On peut en tout cas admettre en première approximation que l'ensemble de la fraction C.A.M. présente dans les 34 cm³ de sérum devait être supérieure de 100 mg. au poids de la fraction A₆, c'est-à-dire peser à peu près 180 mg. contenant 40 mg. de lipides et 140 mg. de pro-

téides. Si nous rapportons ce résultat au titre de sérum nous trouvons : 3,5 g. de C.A.M. par litre constitués par 1,18 g. de lipides et 4,12 g. de protéides. La quantité totale de lipides présents dans l'ensemble des albumines d'un sérum de cheval sain oscille au voisinage de 4 grammes par litre de sérum. Le présent sérum contenait : 3,7 g. de lipides liés aux albumines : nous pouvons donc affirmer que c'est tout au plus un tiers des lipides liés aux albumines qui se trouve dans l'état si particulier qui caractérise la fraction C.A.M.

Le sérum étudié contenait 6 grammes de lipides totaux par litre (un peu plus de 2 grammes était lié aux globulines et un peu moins de 4 grammes aux albumines). Les lipides de la fraction C.A.M. représentent donc à peu près le sixième des lipides totaux de ce sérum. Malgré le peu de précision de l'extrapolation à laquelle nous nous sommes livrés, ce résultat est intéressant à considérer, car c'est la première fois qu'est déterminée la proportion des lipides totaux du sérum qui entre dans la constitution de la fraction C.A.M. Les cinq sixièmes environ des lipides du sérum sont donc sous un état différent du C.A.M. Ils entrent dans la constitution de simples cénapses de solvatation qui sont celles que peuvent décomposer les savons alcalins en présence d'éther.

De l'examen de résultats ci-dessous, on peut, en outre, déduire qu'il est possible de comparer la teneur des sérums en C.A.M. par une méthode fort simple : en déterminant, par exemple, la teneur d'un sérum en fraction A_4 obtenue dans des conditions rigoureusement comparables, on peut savoir si ce sérum est plus ou moins riche en C.A.M. Nous choisissons la fraction A_4 obtenue par 4 lavages, car nous avons vu que les lavages ultérieurs ne font pas sensiblement changer la constitution de la fraction. La fraction A_4 obtenue dans les conditions où nous nous sommes placés ici doit correspondre à un peu moins de la moitié de la totalité des C.A.M. présents dans le sérum étudié ci-dessus. Mais s'il est impossible de préciser mieux que par une hardie extrapolation la quantité totale de C.A.M. présente dans le sérum, on doit

au moins admettre que si les quatre lavages qui conduisent à l'obtention de A_4 sont toujours effectués dans des conditions rigoureusement identiques, la quantité de C.A.M. qu'ont fait perdre ces lavages est rigoureusement la même pour toutes les expériences que l'on peut effectuer et A_4 représente, en somme, la quantité de C.A.M. qui existe dans le sérum en excès par rapport à ce que dissolvent nécessairement les lavages pour isoler cette fraction. Si nous appelons P cette quantité inconnue qui se perd par quatre lavages, et que nous savons, par extrapolation, être de l'ordre de 3 grammes par litre de sérum, la quantité réelle de C.A.M. est $Q + A_4$; et puisque Q est constante, si l'on opère toujours de la même façon, la détermination de A_4 peut renseigner sur les variations quantitatives des teneurs en C.A.M. des sérums. Il est évident que si un sérum contenait moins de C.A.M. que Q grammes par litre, on obtiendrait un résultat nul pour A_4 . Nous verrons que ceci a lieu pour les sérums de mouton et de cobaye; mais pour le cheval, que nous étudierons tout d'abord, la fraction A_4 est toujours abondante et facilement déterminable.

Avant d'aborder l'étude comparative de divers sérums, nous rapporterons ici quelques résultats de nos essais préliminaires chez le cheval, car ces essais confirment entièrement les résultats obtenus dans l'expérience détaillée que nous venons d'exposer.

VÉRIFICATION DE LA CONSTANCE DES RÉSULTATS POUR UN MÊME SÉRUM.

Nous avons à maintes reprises déterminé la quantité de fraction A_4 obtenue pour un même sérum sur deux échantillons différents afin de savoir quelle était la fidélité de la technique. Cette fidélité est remarquable. Voici quelques résultats qui le prouvent :

Dans un premier sérum (essais préliminaires), nous avons seulement effectué deux lavages, un par 7 cm³, l'autre par

4 cm³ pour 20 cm³ de sérum. La fraction obtenue ne correspondait pas exactement à A₂, mais nous avons trouvé :

pour une première prise d'essai de 20 cm³ de sérum :

protéides, 289 mg.;

lipides, 28 mg.;

pour une deuxième prise d'essai de 20 cm³ du même sérum :

protéides, 300 mg.;

lipides, 30 mg.

Pour un autre sérum de cheval, en opérant exactement comme il fallait pour obtenir les fractions A₄ et A₃, nous avons obtenu les deux résultats suivants, qui sont en tous points comparables à ceux de notre expérience plus complète qui nous avait permis de tracer les courbes données ci-dessus.

$$A_3 \text{ (pour 18 cm}^3 \text{ de sérum) rapport } \frac{\text{lipides}}{\text{protéides}} = 0,32;$$

$$A_4 \text{ (pour 18 cm}^3 \text{ de sérum) rapport } \frac{\text{lipides}}{\text{protéides}} = 0,22;$$

Analyse des lipides de la fraction A₄ pour vérifier qu'ils correspondent bien à ceux de la fraction C.A.M.

Nous avons analysé les lipides contenus dans la fraction A₄ de façon à savoir s'ils correspondaient bien à ceux que Machebœuf a démontré être les constituants des C.A.M. obtenus par sa méthode originale.

Pour pouvoir effectuer cette analyse, il nous fallait opérer sur une masse assez grande de la fraction A₄. Nous avons fait une préparation de cette fraction en partant de 100 cm³ de sérum de cheval. Nous avons divisé également cette prise d'essai en deux grands tubes d'un gros centrifugeur et nous avons, dans chacun des tubes, opéré les précipitations et les lavages par les volumes de solution saturée en sulfate d'ammonium, d'acide dilué, d'eau distillée, rigoureusement

correspondant au volume de sérum utilisé ici, de façon que l'expérience soit en tous points comparable à celles que nous avons effectuées sur des volumes plus faibles de sérum.

La fraction A₄ obtenue contenait 600 mg. de protéides et 486 mg. de lipides que nous avons séparés par l'alcool bouillant et l'éther comme d'habitude. C'est sur ces 486 mg. de lipides qu'a porté notre étude.

VÉRIFICATION DE LA PRÉSENCE DES PHOSPHO-AMINO-LIPIDES
DANS LES LIPIDES DE LA FRACTION A₄.

On sait que la fraction C.A.M. de Machebœuf est très riche en phospho-amino-lipides, un peu plus de 50 p. 100 des lipides totaux de cette fraction. Nous avons donc repris nos lipides par un peu d'éther puis ajouté un fort excès d'acétone pour précipiter les phospho-amino-lipides et nous avons effectivement constaté l'apparition d'un très abondant précipité contenant 3,6 p. 100 de phosphore (qui fut dosé après destruction sulfo-nitrique des lipides, par la technique titrimétrique de Machebœuf). Or la lécithine purifiée contient 3,84 p. 100 de phosphore. Le poids de ce précipité nous permit de calculer que les lipides de notre fraction A₄ contenaient un peu plus de 30 p. 100 de phosphatides, chiffre un peu plus faible que celui qu'on a trouvé pour les fractions C.A.M., mieux purifiés, obtenues par la technique de Machebœuf, ce qui n'a rien de surprenant puisque l'auteur a dû poursuivre très loin son fractionnement pour que la teneur en phosphatides atteigne asymptotiquement sa valeur maximale.

Nous avons ensuite déterminé la teneur des lipides de A₄ en cholestérol total. Pour cela, après saponification d'une partie aliquote de ces lipides, nous avons dosé pondéralement le cholestérol par la méthode de Windauss-Caminade (pesée du complexe digitonoside cholestérol). Nous avons trouvé que le cholestérol représentait 14,7 p. 100 des lipides de la fraction A₄, ce qui correspond très bien à la teneur

trouvée par Machebœuf dans les lipides de sa fraction C.A.M. purifiée (17,9 p. 100 d'esters de cholestérol). Nous avons voulu vérifier que le cholestérol se trouvait bien comme dans les C.A.M. mieux purifiés, à l'état d'esters et non à l'état libre. Pour cela nous avons, sur une portion aliquote des lipides de A₄, pratiqué la précipitation du complexe digitoxinose-cholestérol selon Windauss-Caminade, sans saponification préalable des lipides; on sait que, dans ces conditions, le cholestérol, qui est à l'état d'ester, ne précipite pas, tandis que le cholestérol libre précipite. Nous avons ainsi pu vérifier que la proportion de cholestérol libre dans les lipides de A₄ est très faible (2,5 p. 100 seulement des lipides), ce qui montre encore une fois que notre fraction A₄ est bien une fraction C.A.M. déjà assez convenablement purifiée.

Les essais précédents nous prouvent que la technique simple qui nous a conduits à préparer la fraction A₄ nous fournit, en somme, une fraction C.A.M. déjà assez propre, avec une fidélité expérimentale tout à fait satisfaisante. Nous avons alors comparé trois nouveaux sérums de chevaux à ceux déjà étudiés, de façon à savoir quelles étaient les variations individuelles pour les C.A.M. que pouvait déceler cette technique. Les résultats obtenus par ces essais sont rassemblés dans le tableau ci-dessous, où ne figurent que les chiffres correspondant aux fractions A₄.

	Poids total de la fraction A ₄ par litre de sérum	Rapport $\frac{\text{Lipides}}{\text{protéides}}$ dans A ₄
1 ^{er} cheval	3,2 g.	0,28
2 ^e cheval	7,8 g.	0,31
3 ^e cheval	7,3 g.	0,37

Les teneurs en fraction A₄ sont assez variables, mais la constitution de cette fraction est remarquablement constante, le rapport $\frac{\text{lipides}}{\text{protéides}}$ est toujours voisin de 0,3. Rappelons que pour le sérum qui nous avait permis de tracer des courbes, nous avons obtenu comme poids de fraction A₄ 2,9 g. par litre et comme rapport 0,273.

Or la fraction A₄ ne correspond qu'à l'excédent de C.A.M.

par rapport à ce qu'ont dissous les lavages et qui se présente à peu près 3 grammes. Nous pouvons conclure que la teneur en C.A.M. des sérums de chevaux oscille entre 6 et 11 grammes par litre autour d'une moyenne probablement voisine de 8 grammes. Il est curieux de constater qu'une fraction aussi abondante et aussi différenciée ait pu passer inaperçue aux nombreux chercheurs qui ont étudié le sérum sanguin, avant qu'en 1928, Machebœuf ne la mette en évidence. Ce fait est probablement dû à l'opinion alors régnante, qui admettait que les protéides étaient des substances d'affinités chimiques faibles peu aptes à s'unir à d'autres substances. On pensait à peu près unanimement que les protéides étaient des « colloïdes », particules solides, simplement suspendues dans le liquide aqueux qui les baignait, mais dont elles restaient toujours plus ou moins indépendantes. On sait aujourd'hui, au contraire, combien ces substances, qui sont en vraie solution dans le sérum, sont aptes à réagir sur une infinité de substances non protéidiques, pour former des combinaisons ou des cénapses dont le rôle biologique est primordial.

Nous avons cherché à nous renseigner sur l'extension des cénapses C.A.M. dans la série animale en isolant des fractions A₄ de sérum de vertébrés d'espèces différents. Ces essais, qui nous ont conduits à quelques résultats intéressants, font l'objet du chapitre suivant.

Recherches sur des sérums d'espèces animales différentes et sur du sérum humain.

L'existence des cénapses acido-précipitables de Machebœuf, très peu solubles dans l'eau à pH 4 ou 3,8 est-elle générale dans tous les sérums de vertébrés, ou n'est-elle qu'une caractéristique de l'espèce cheval ? Voilà un premier problème, qu'il nous était possible d'aborder lorsque nous eûmes mis au point la technique de séparation de la frac-

tion A₄ qui permet, nous l'avons vu, de se renseigner sur la teneur du sérum de cheval en C.A.M.

Nous avons donc étudié toute une série de sérums sanguins d'espèces diverses : bœuf, mouton, lapin, cobaye, porc, chien, poule; puis nous avons également étudié un sérum humain normal.

TECHNIQUE.

Dans tous les cas, nous avons opéré sur 18 cm³ de sérum. Ce volume était parfaitement adapté au contenu possible de nos tubes centrifugeurs, si bien que toutes les opérations pouvaient être effectuées sans transvasement. Les globulines furent précipitées par 18 cm³ de solution saturée de sulfate d'ammonium. La petite quantité d'albumine qui avait été entraînée par les globulines lors de cette précipitation fut récupérée en dissolvant les globulines dans 3 cm³ d'eau; puis en les précipitant une deuxième fois par addition de 3 cm³ de solution saturée de sulfate d'ammonium. Les solutions mères des deux précipitations des globulines furent réunies dans un tube à centrifuger. C'est sur la solution ainsi obtenue qui contenait la totalité des albumines de 18 cm³ de sérum que porta chaque fois notre étude.

La solution des albumines fut additionnée de sulfate d'ammonium en poudre fine jusqu'à l'apparition d'un louche léger persistant à l'agitation. On ajoute alors goutte à goutte en agitant une solution demi-normale d'acide sulfurique. On poursuit cette addition tout d'abord tant que le précipité d'albumines qui se forme augmente manifestement. On poursuit encore l'addition d'acide très progressivement, mais en suivant après chaque addition les variations de pH par touche sur un papier au rouge de méthyle. Lorsque le virage au rouge franc du papier est obtenu, on touche également sur le papier au rouge Congo, et on poursuit l'addition d'acide jusqu'à très léger début de virage lilas. Le pH est alors voisin de 4. On agite pendant cinq minutes, puis

on centrifuge; les albumines se rassemblent en un culot compact qu'il est facile de séparer du liquide surnageant. On jette ce dernier après avoir vérifié par addition de deux gouttes d'acide sulfurique que la précipitation avait été totale.

Le culot d'albumine est repris par 4 cm³ d'eau. Pour éviter la formation de grumeaux, nous avons ajouté ce volume d'eau par fractions de 1 cm³ en agitant soigneusement après chaque addition, de manière à réaliser tout d'abord une pâte crémeuse homogène dans laquelle l'agitateur de verre écrase facilement les grumeaux. Puis on ajoute le reste de l'eau. On agite de nouveau et on laisse en contact pendant un quart d'heure, en agitant de temps à autre. Le mélange est alors soumis à une centrifugation à 8.000 tours environ pendant cinq minutes. Le culot correspond à la fraction A₁. Il est séparé de son eau-mère par décantation et traité comme ci-dessus par 4 cm³ d'eau. Le culot obtenu après ce lavage est la fraction A₂, que l'on soumet à un troisième et à un quatrième lavages pratiqués l'un et l'autre au moyen de 3 cm³ d'eau seulement, on obtient ainsi finalement la fraction A₄ dans laquelle on dose les protéides et les lipides.

Pour effectuer ces dosages, on dissout la fraction A₄ dans 1,5 cm³ d'eau en ajoutant deux gouttes d'une solution d'ammoniaque, obtenue en diluant au cinquième de l'ammoniaque commerciale. On ajoute en agitant 20 cm³ d'alcool à 96°, puis on trempe le tube dans un bain-marie contenant de l'eau chaude. On règle la température pour maintenir l'alcool en ébullition très douce. Après dix minutes on laisse refroidir dans le bain-marie dont on fait cesser le chauffage. L'alcool est alors recueilli par décantation, puis on traite le coagulum deux fois encore par 20 cm³ d'alcool bouillant. Les solutions alcooliques obtenues par ces lavages sont réunies à la première. Le coagulum protéidique est alors additionné de 20 cm³ d'éther. On agite, on porte l'éther à l'ébullition, en trempant le tube dans un bain-marie tiède; puis on laisse en contact pendant une heure. On recueille

l'éther que l'on joint aux solutions alcooliques. Le coagulum est traité de nouveau par 20 cm³ d'éther que l'on laisse en contact jusqu'au lendemain. L'éther est recueilli et réuni aux solutions alcooliques et éthérées déjà rassemblées. Cet ensemble alcool-éthéré servira au dosage des lipides (voir plus loin). Le coagulum protéidique est lavé une fois rapidement avec 5 cm³ d'alcool pour en éliminer l'éther. Cet alcool est jeté, puis on lave le coagulum deux fois par 20 cm³ d'eau distillée chaude pour enlever les substances hydrosolubles. Finalement le coagulum est transvasé dans un godet taré. Pour faciliter ce transvasement, le coagulum est mis en suspension dans quelques centimètres cubes d'alcool, puis on entraîne les dernières parcelles de coagulum au moyen d'un peu d'alcool. Le godet taré avec son contenu est placé sur une platine chauffante pour évaporer l'alcool sans qu'une ébullition puisse produire des pertes par projection. On place ensuite le godet dans une étuve à 105° où il est laissé jusqu'au lendemain. On le met ensuite dans un dessiccateur à vide en présence d'anhydride phosphorique, jusqu'à poids constant. La pesée de ce godet permet de connaître le poids des protéides de la fraction A₄.

Pour déterminer le poids des substances lipoidiques contenues dans la fraction, on place la solution alcool-éthérée qui contient ces lipides dans un ballon de 250 cm³ dont le col est muni d'un rodage permettant de lui adapter un réfrigérant descendant. A ce réfrigérant est, d'autre part, adapté un ballon destiné à recueillir les solvants distillés. Grâce à une tubulure du ballon de condensation, on opère une bonne dépression par une pompe à eau. On distille ainsi complètement, à une température modérée, l'éther et l'alcool (et aussi la petite quantité d'eau provenant de la solution de la fraction A₄). Il reste finalement un résidu à peu près sec que l'on dessèche plus complètement en plaçant le ballon dans un grand dessiccateur à vide pendant une nuit. Le lendemain, on dissout les lipides du ballon dans une vingtaine de centimètres cubes de chloroforme et la solution est filtrée

pour éliminer quelques substances non lipoïdiques insolubles dans le chloroforme. On lave ballon et filtre à plusieurs reprises avec quelques centicubes de chloroforme. La solution chloroformique filtrée est placée dans une fiole de Fourneau tarée, puis le chloroforme est évaporé sous courant d'azote en chauffant modérément sur une plaque chauffante électrique. Le résidu est constitué par l'ensemble des lipides que l'on dessèche jusqu'à poids constant dans un dessiccateur à vide avant de les peser.

Dans le tableau ci-contre sont rassemblés les résultats fort curieux que nous avons obtenus pour la série de sérums d'animaux divers et d'homme que nous avons étudiés. Nous avons dans ce tableau reproduit les chiffres déjà donnés ci-dessus pour 4 chevaux afin qu'ils puissent être comparés à ceux obtenus pour les autres espèces animales.

Pour presque tous les sérums, nous avons fait la détermination sur deux échantillons traités parallèlement afin de vérifier la fidélité de la technique et pour éviter toute erreur. Nous donnons donc dans ce tableau plusieurs fois deux chiffres pour le même animal.

Constitution des fractions A₁ obtenues pour des sérums d'espèces animales diverses et pour du sérum humain.

	POIDS TOTAL de la fraction	RAPPORT LIPIDES. PROTÉIDES	EXPÉRIENCE TÉMOIN DOUBLANT LA PRÉCÉDENTE	
			Poids total	Rapport
Sérums de chevaux.	n° 1..	3,2	0,28	—
	n° 2..	7,8	0,31	—
	n° 3..	7,3	0,37	—
	n° 4..	2,9	0,27	—
Sérum humain	29	0,07	—	—
Sérums de bœufs ..	n° 1..	20	0,08	23
	n° 2..	20	0,085	—
Sérum de porc	31	0,046	35	0,041
Sérum de mouton	0	—	0	—
Sérum de chien	35	0,18	34,5	0,177
Sérum de cobaye	0	—	0	—
Sérum de lapin	17	0,50	—	—
Sérum de poule	20	0,40	19,5	0,42

Constatons tout d'abord que pour tous les sérums pour lesquels il a été possible d'effectuer deux déterminations parallèles sur deux prises d'essai identiques, les résultats sont remarquablement concordants. Notons ensuite que pour les sérums de mouton et de cobaye on n'obtient pas de fraction A_1 , car toutes les albumines précipitées à pH 4 se dissolvent sans laisser de résidu lorsqu'on les reprend par de l'eau distillée. Pour le mouton en particulier, le phénomène est d'une netteté remarquable. Après le deuxième lavage (fraction A_2), dans une expérience faite sur un autre sang de mouton, il ne restait plus que 20 milligrammes de protéides et 6 milligrammes de lipides; et dès le troisième lavage (fraction A_3) il ne restait plus rien. Nous avons pour cet animal effectué une expérience très complète analogue à celle rapportée ci-dessus pour le cheval et voici les résultats obtenus :

Fraction A_1 (un seul lavage de 3,7 cm³ d'eau pour 18 cm³ de sérum) :

protéides, 0,463;

lipides, 0,087.

Fraction A_2 (deux lavages par 3 cm³ 7 d'eau) :

protéides, 0,020;

lipides, 0,006.

Fraction A_3 (trois lavages dont deux par 3,7 cm³ d'eau et un troisième par 3 cm³ d'eau) :

protéides, traces indosables;

lipides, traces indosables.

Fraction A_4 (quatre lavages) :

protéides, 0;

lipides, 0.

Chez le mouton par conséquent, il n'existe pas de cénapses (C.A.M.) ou bien il en existe beaucoup trop peu pour qu'on

puisse en séparer par la technique que nous utilisons. Nous avons vu que chez le cheval la quantité de C.A.M. devait être de l'ordre de 8 grammes par litre de sérum. Elle doit être inférieure à 2 grammes chez le mouton, sinon nous aurions une fraction A_3 encore abondante. Ce fait est important à considérer, car il est une preuve de plus apportée en faveur de l'existence elle-même des cénapses (C.A.M.) dans le sérum de cheval, car autrefois certains auteurs, surpris de voir découvrir une fraction si abondante jusqu'alors insoupçonnée dans le sérum, pensèrent que les fractions C.A.M. étaient peut-être des artéfacts créés aux dépens des protéides et des lipides du sérum par l'action de l'acidification légère à laquelle on devrait soumettre les albumines pour le fractionnement. Puisque rien de comparable n'est obtenu chez le mouton et chez le cobaye, c'est que l'acidification dans les conditions où l'on opère pour séparer les C.A.M. est bien incapable de créer une fraction C.A.M. aux dépens des protéides et des lipides qui existent dans les sérums de mouton et de cobaye comme dans les sérums de chevaux. Nous ferons d'ailleurs remarquer que les conditions dans lesquelles nous opérons sont encore moins favorables à une dénaturation quelconque des protéides que ne l'était la technique originale de Machebœuf. L'ensemble des opérations qui conduit à l'obtention de la fraction A_4 à partir de la solution des albumines ne dure pas même quatre heures et l'acidification à laquelle sont soumises les albumines est faible : nous opérons vers pH 4, c'est-à-dire très près de l'isoélectrique des albumines, qui est 4,7. Nous avons d'ailleurs, pour vérification, pratiqué sur un sérum de cheval une recherche des C.A.M. en opérant à pH 4,6, c'est-à-dire au virage du rouge de méthyle. Dans ces conditions, nous étions à l'isoélectrique des albumines, donc dans des conditions optimales pour ne pas dénaturer ces protéides, nous avons également obtenu une fraction A_4 en tous points comparables à celle obtenue à pH 4.

D'autres faits intéressants sont mis en évidence par les résultats que nous avons obtenus en étudiant les sérums d'espèces animales variées : ni pour le sérum humain, ni pour les autres sérums animaux que nous avons étudiés, nous n'avons trouvé une fraction A_4 identique à celle du cheval. Le rapport lipides/protéides était toujours beaucoup plus faible que chez le cheval : chez le porc, le bœuf et l'homme, ce rapport était environ 5 fois plus petit que chez le cheval; chez le chien cependant il était moins faible et atteignait un peu plus de la moitié de la valeur qu'il présente chez le cheval. De plus, pour tous ces sérums, la valeur de la fraction A_4 était cinq à dix fois plus grandes que chez le cheval, si bien que la masse des lipides contenue dans la fraction A_4 était tout de même voisine de celle que l'on rencontre dans les fractions A_4 de cheval. Comment interpréter ces faits ? Il se peut que chez ces animaux et chez l'homme il existe une fraction assez importante des albumines qui soit peu soluble à pH 4 et qui accompagne une fraction C.A.M. analogue à celle du cheval.

Pour vérifier ou infirmer cette hypothèse, nous avons, sur un sérum de bœuf, effectué une série de déterminations analogues à celles qui, pour le sérum de cheval, nous avaient permis de tracer les courbes (figurées p. 33). Nous avons comparé entre elles des fractions A_4 , A_5 , A_6 obtenues par quatre, cinq ou six lavages successifs. Si, en effet, une différence de solubilité assez nette permettait de distinguer les C.A.M. proprement dits d'avec une fraction protéidique spéciale peu soluble à pH 4, nous aurions pu voir que la constitution des fractions successives était progressivement croissante au fur et à mesure de l'enlèvement par les lavages de celui des deux constituants mélangés qui serait le plus soluble. Il n'en a rien été, et dès le quatrième lavage, la constitution de la fraction ne varie plus suffisamment pour que les différences dépassent les limites des erreurs expérimentales.

Voici les chiffres qu'ont fournis nos dosages pour 16 cm³ de sérum de bœuf :

	Fractions		
	A ₄ (4 lavages)	A ₅ (5 lavages)	A ₆ (6 lavages)
Protéides	0,305	0,295	0,290
Lipides	0,028	0,025	0,020

Les cinquième et sixième lavages ne dissolvent plus qu'une toute petite quantité de lipides et de très faibles quantités de protéides. Peut-être ce qui se dissout ainsi correspond-il à un peu de véritable C.A.M. qui serait un peu plus soluble que les protéides particuliers, qui l'accompagnent grâce à leur faible solubilité à pH 4. Des expériences plus complètes devraient être entreprises à ce sujet.

Notons enfin que chez le chien que nous avons étudié, la fraction A₄ était extrêmement abondante et très riche en lipides. Le poids des lipides qu'elle contenait représentait 6,30 g. de lipides par litre de sérum, ce qui est considérable (chez le cheval, la quantité de lipides présents dans A₄ est, en général, de 1 à 2 grammes par litre). Le sérum de chien est donc un objet d'études intéressant pour des essais ultérieurs.

Nous avons enfin étudié le sérum de poule, et chez cet animal nous avons obtenu comme fraction A₄ une fraction correspondant en tous points à la fraction C.A.M. Notre fraction A₄ de poule contenait presque autant de lipides que de protéides. Le sérum de poule est donc également un bon objet d'études pour des recherches futures.

CONCLUSIONS

Nous avons repris les essais de Machebœuf et Januszkiewicz, qui ont mis en évidence, dans le sérum de cheval, l'existence d'une fraction très particulière constituée par des cénapses lipidiprotéidiques particulièrement stables, peu soluble en milieu acide (pH 4 à 4,5). Cette fraction (C.A.M.) n'avait jusqu'ici été obtenue qu'en mettant en œuvre la technique fort compliquée et d'exécution très longue que Machebœuf avait mise au point lorsqu'il découvrit son existence. Les travaux de Machebœuf et Januszkiewicz laissaient espérer que la technique d'isolement des C. A. M. pouvait être simplifiée. Or, l'étude des variations physiologiques et pathologiques des teneurs du sérum en C. A. M. n'était susceptible d'être abordée que si l'on possédait une méthode simplifiée permettant d'isoler des C. A. M. dans un état suffisant de purification. De plus, on n'avait jamais précisé la teneur du sérum de cheval en C. A. M., car le rendement de la méthode d'obtention de cette fraction était inconnue; nous avons eu la chance de pouvoir préciser l'ordre de grandeur de la teneur du sérum de cheval en C. A. M. : 8 grammes environ par litre. Pour cela, nous avons tracé les courbes représentatives des variations quantitatives des divers constituants de la fraction au cours de sa purification par lavages; ces courbes nous ont permis de connaître la solubilité de la fraction dans les solutions de lavage; puis de calculer la teneur approximative du sérum en C. A. M. grâce à une extrapolation.

Il est impossible de séparer quantitativement du sérum de la totalité des C. A. M., car leur solubilité n'est pas assez différente de celle des albumines; une forte proportion des C. A. M. reste dans les solutions où sont dissoutes les albu-

mines que l'on sépare des C. A. M.; si l'on opère la séparation dans des conditions rigoureusement déterminées et constantes, la quantité de C. A. M. que l'on perd ainsi par solubilité est constante et la fraction finale que l'on obtient (fraction A₄ dans notre travail) est fonction de la teneur du sérum en C. A. M. L'étude de cette fraction finale renseigne donc sur les variations de la teneur du sérum en C. A. M. La quantité de C. A. M. qui se perd par dissolution dans les eaux-mères et les eaux de lavages est de l'ordre de trois grammes dans le cas du sérum de cheval, et la fraction finale obtenue malgré ces pertes varie chez le cheval de deux à huit grammes par litre de sérum.

Chez le mouton et le cobaye, on n'obtient pas trace de fraction finale A₄. Les albumines précipitées à pH 4 par du sulfate d'ammonium se remettent entièrement en solution si on les traite par la quantité d'eau distillée, cependant minime qui sert à pratiquer les lavages. Les sérums de mouton et de cobaye ne contiennent donc pas de fraction C. A. M. en quantité suffisante pour qu'il en reste un excès non dissous dans les conditions optimales pour l'isolement des C. A. M. L'étude des conditions de dissolution des albumines au cours de ces essais nous permet d'affirmer que le sang de mouton contient sûrement moins de deux grammes de C. A. M. par litre.

Pour les sérums d'homme, de bœuf, de porc et de lapin, la séparation des C. A. M. est impossible par notre technique pour une autre raison : des albumines peu solubles à pH 4 ou 4,5, existent dans ces sérums et ne peuvent pas être séparés des C. A. M. par de simples lavages à l'eau; mais tout semble bien nous prouver que, dans ces sérums, il existe une quantité importante des fractions C. A. M. très comparables à celles du sérum de cheval.

Dans le sérum de chien, les lipides fixés à des albumines pour former des C. A. M. sont extrêmement abondants. Les C. A. M. sont malheureusement en présence d'une certaine quantité d'albumines peu solubles à pH 4 qui les accompagnent dans les fractionnement.

Dans le sérum de poule, enfin, les C. A. M. sont particulièrement abondants et faciles à séparer. On obtient, après quatre lavages des albumines à pH 4,1, un résidu abondant constitué par 40 à 45 p. 100 de lipides et 55 à 60 p. 100 de protéides. La fraction ainsi obtenue est parfaitement soluble dans l'eau quand le pH est supérieur à 6. Cette fraction présente tous les caractères que Machebœuf a décrits pour les C. A. M. du sérum de cheval : les lipides qui sont dans cette fraction sont solubles dans l'eau, en milieu neutre ou alcalin, et ne se laissent pas enlever par l'éther à leur solution aqueuse, même si l'on ajoute à la solution des quantités importantes de savons ou un peu d'alcool.

L'étude des variations physiologiques des teneurs des sérums en C. A. M. est possible grâce à la technique relativement très simple que nous avons pu mettre au point. Et cette technique peut être mise en œuvre sur 15 cm³ de sérum seulement.

VU, BON A IMPRIMER :

VU : *Le Doyen,*
PIERRE MAURIAC.

Le Président,
M. MACHEBŒUF.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :
Bordeaux, le 29 juin 1939.
Le Recteur de l'Académie,
G. BOUSSAGOL.

BIBLIOGRAPHIE

- MACHEBOEUF (M.-A.). — Thèse de doctorat ès sciences, Paris, 1928, et *Bull. de la Soc. de chir. biol.*, 1929, **11**, 268 à 293.
- CIACCIO. — *Boll. della. soc. di Biol. Sperim.*, 1926, **1**, 144.
- MACHEBOEUF (M.-A.). — *C. R. Acad. des sc.*, 1931, **192**, 1413.
- MACHEBOEUF et SANDOR (G.). — *Bull. de la Soc. de chim. biol.*, 1931, **13**, 745.
- LINDERSTROM-LANG (K.) et SCHMIDT. — *C. R. Labor. Carlsberg*, 1930, **18**, n° 3.
- HORSFALL et GOODNER. — *Journal of Bact.*, **35**, 1938, 207 à 212, et *Journ. of exper. med.*, 1936, **64**, 855 à 863.
- MACHEBOEUF (M.-A.) et SANDOR (G.). — *Bull. de la Soc. de chir. biol.*, 1932, **14**, 1168 à 1190.
- MACHEBOEUF (M.-A.) et SAMSZKIEWICZ (Mme). — *Bull. de la Soc. de chim. biol.*, 1937, **19**, 694.
- MACHEBOEUF (M.-A.) et TAYEAU (F.). — *C. R. de la Soc. de biol.*, 1938, **129**, p. 1181 et 1184, et 1939, **130**, p. 481; thèse doctorat ès sciences, Bordeaux (TAYEAU).
- HARDY (W.-B.) et GARDNER (S.). — *Journ. of Physiol.*, 1910, **40**, 68.
- MACHEBOEUF (M.-A.) et WAHL (R.). — *Bull. de la Soc. de chim. biol.*, 1931, **13**, 486, 504, 511, 736, 745.
- MACHEBOEUF (M.-A.). — *Etat des lipides dans la matière vivante, les cénapses et leur importance biologique*, 1 vol., Paris, 1937, Hermann, édit.
- WILLSTAETTER (R.) et ROHDEWALD (M.). — *Zeitschr. für Physiol. Chem.*, 1934, **225**, 110.

- PZYLECKI (S.-J.). — *C. R. du VI^e Congrès de la chimie biologique de Lyon*, 1937; rapports du Congrès, p. 115 à 172.
- HOFMEISTER. — *Arch. für exp. Path. und Pharm.*, 1880 à 1890, t. 24 à 28.
- CAMINADE. — *Bull. de la Soc. de chim. biol.*, 1922, t. 4, p. 601.
- LANDSTEINER. — *The specificity of serological reactions*, 1 vol., Londres, 1936, Tindall and Co., édit.
- MACHEBOEUF. — *Bull. de la Soc. de chim. biol.*, 1926, t. 7, p. 464.

